

# von Willebrand 因子 (vWF) のヒト Type III collagen への結合に関する研究

## I. ヒト Type III collagen を用いた正常血漿中の vWF の collagen 結合

奈良県立医科大学小児科学教室

西 久 保 敏 也

### STUDY ON BINDING OF VON WILLEBRAND FACTOR TO HUMAN TYPE III FIBRILLAR COLLAGEN I. A NEW ASSAY OF COLLAGEN-BINDING OF VON WILLEBRAND FACTOR (VWF) IN NORMAL PLASMA USING HUMAN TYPE III FIBRILLAR COLLAGEN

TOSHIYA NISHIKUBO

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received September 28, 1990

*Summary*: A new assay system of the binding of vWF to collagen was established using human Type III fibrillar collagen suspension. The principle of this method is as follows: a small amount of sample plasma was added to a suspension containing human Type III collagen; after centrifugation, vWF: Ag level in the supernatant was measured by ELISA; then collagen binding was estimated according to the formula:

$$\text{collagen binding (\%)} = (A - B) / A \times 100$$

where,

A=vWF: Ag after binding with denatured collagen (heat-treated at 80°C for 1hr) and

B=vWF: Ag after binding with fibrillar collagen.

When a purified vWF sample was used in this assay, all vWF: Ag was bound to the collagen fiber. On the other hand, addition of an anti-vWF monoclonal antibody (NMC-vW/3), which recognizes collagen binding domain of vWF subunit, inhibited binding of vWF to collagen completely, but EDTA or heparin did not. The collagen binding in 50 normal adult plasmas was 84.0%~98.1% ( $93.4 \pm 2.6\%$ ) and vWF: Ag  $\times$  collagen binding/100 correlated well to Rcof activity. The assay system is very simple technically and could be useful to measure the binding of vWF to collagen.

### Index Terms

von Willebrand factor, collagen binding, human Type III collagen

### 緒

### 言

von Willebrand 因子 (vWF) は損傷血管壁への血小板の粘着に関する重要な血漿高分子蛋白で、染色体

No.12 上の von Willebrand 因子遺伝子 (12pter-p12) の支配を受け<sup>1)</sup>, 血管内皮細胞および骨髄巨核球内で合成されることが知られている<sup>2)</sup>. 本因子は生体内では損傷血管壁の血管内皮下組織の collagen 線維特に type III

collagen と結合し、一方血小板とは血小板膜糖蛋白 (glycoprotein; GP) Ib および GPIIb/IIIa と結合する血漿止血因子と考えられている<sup>3)4)</sup>。血漿 vWF は SDS アガロースゲル電気泳動法<sup>5)</sup>の解析にて  $0.5 \times 10^6$  dalton 前後から  $10 \sim 20 \times 10^6$  dalton におよぶ連続した multimer 構造を形成し、個々の multimer は 2050 のアミノ酸配列を有する subunit から成り立っていることが知られている<sup>6)</sup>。さらに vWF subunit の機能ドメインについての解析も進められ、Ser 1~Arg 272 が第VIII因子結合ドメイン、Val 449~Lys 728 が血小板膜糖蛋白 GPIb 結合ドメインおよびヘパリン結合ドメイン、1744 から 1747 の Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) が GPIIb/IIIa 結合ドメインであることが明らかとなった<sup>7)8)9)10)</sup>。

vWF の collagen 結合に関与するドメインについての解析も進められている。Sixma et al.<sup>11)</sup>はトリプシン分解で得られた fragment の中で 48kDa のポリペプチドが選択的にヒト臍帯由来の type I および type III collagen と結合することを見だし、その残基は 730~1114 と考えられ、また Kalafatis et al.<sup>12)</sup>は staphylococcus protease V8 (SP-V8) による酵素分解で得られた残基 911~1365 が同様に collagen 結合を有することを示した。一方、Roth et al.<sup>13)</sup>は還元・アルキル化した vWF subunit のシアン化プロマイド分解産物である残基 542~622 と 948~998 の 2 つの非連続ポリペプチドが monomeric type III collagen への結合を抑制することを報告し、Pareti et al.<sup>14)</sup>はトリプシン分解にて得られた 52/48kDa fragment (アミノ酸残基 449~728) と 55kDa fragment (アミノ酸残基 730~1114) がともに vWF の collagen 結合を抑制することを報告した。従って現在 vWF の collagen 結合部位の 1 つはアミノ酸残基 911~1114 にある事は確実と思われるが、GPIb 結合ドメインとオーバーラップする第二の collagen 結合ドメインの部位およびその機能に関してはなお今後の検討に待たれている。

これらの vWF の collagen 結合ドメインの検索は純化 vWF を用いたもので、ヒト血漿中の vWF の collagen 結合に関する報告としては、凝集メーターを用い透過度変化から算出する方法<sup>15)</sup>や、collagen 固相法による ELISA 法<sup>16)</sup>によったものであり、ヒト血漿中の vWF の collagen 結合を液相法で測定した報告としては bovine dermal collagen (95% type I and 5% type III) を用いた Duggan et al.<sup>17)</sup>の報告があるに過ぎない。

今回著者は血漿中 vWF の collagen 結合反応機序の検索を目的として、まずヒト type III collagen を用い液相法での vWF の collagen 結合を測定する方法を確立

し、正常成人血漿中の vWF の collagen 結合について検討した。

## 対象および方法

1. 対象：20~40 歳の健康男子 25 名、女子 25 名について検索した。男女それぞれ 5 名の血漿を等量ずつ混和しプール血漿を作製した。

2. 血漿：プラスチック製ディスポザブル注射器に 21 G 注射針を接続し、各人肘静脈よりすみやかに採取した全血 9 容を直ちに 3.8% クエン酸ナトリウム 1 容の入ったプラスチック製試験管に加えて混和し、3,000 回転 15 分間遠心しクエン酸血漿を得た。

また健康成人男子 5 名は採取した全血を同時にヘパリン入りプラスチック製試験管 (ヘパリン 4 U/ml) および EDTA 入りプラスチック製試験管 (EDTA 5 mmol/L) に加えて混和し前記と同様の操作でヘパリン血漿、EDTA 血漿を得た。

これらの血漿を小量ずつプラスチックチューブに分注し、用に臨むまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

3. vWF の部分純化：有効使用期限を越えた精製第VIII因子濃縮製剤 RCG5 (日本赤十字社より提供) 3 バイアル (第VIII因子 2,500 単位) を 25mM トリス-0.15 M 食塩-0.25 M 塩化カルシウム緩衝液 (pH6.8) に溶解し、3,000 回転 15 分間遠心後その上清を同緩衝液で平衡化したセファロース 4 B ゲルカラム ( $k 5.5 \times 100$  cm) に添加しゲル濾過をおこなった。void volume に溶出された vWF 活性及び抗原を含む分画を vWF 部分純化物として使用した。

4. vWA: Ag の測定：抗 vWF 家兎抗体を 1 次抗体とし、ペルオキダーゼ標識抗 vWF 家兎抗体を 2 次抗体としたサンドウィッチ ELISA (DAKOPATTS, Denmark) 法<sup>18)</sup>にて測定した。

5. リストセチンコファクター (Rcof): von Willebrand 試薬 (Behringwerke, Germany) を用いた肉眼的血小板凝集法<sup>19)</sup>によった。

6. ヒト type III fibrillar collagen 懸濁液の作製：ヒト胎盤由来の type III soluble collagen (SIGMA Chemical Co., St Louis Mo.) を 0.1mol/L 酢酸で濃度 1.5 mg/ml に溶解し  $4^{\circ}\text{C}$  下で 48 時間攪拌後リン酸水素二ナトリウム溶液 (20mmol/L, pH7.5) で 48 時間透析した後再び  $4^{\circ}\text{C}$  下で 16 時間以上攪拌しヒト type III fibrillar collagen 懸濁液を作製した。

7. Collagen 結合 (collagen binding): 血漿 vWF のヒト type III collagen への結合の測定は Duggan et al.<sup>17)</sup>の変法にて行った。対照の熱変性 collagen は fibrillar col-

lagen を 80°C, 1 時間加熱にて作製した. 1.5 ml のポリスチレンチューブ内に, サンプル血漿 20  $\mu$ l を fibrillar collagen あるいは熱変性 collagen 20  $\mu$ l と等量混合後 37°C 15 分間加温したのち, 直ちに 14,000 回転にて 15 分間遠心しそれぞれの上清中 vWF : Ag を ELISA 法にて測定した. Collagen 結合は以下にて算出した.

$$\text{Collagen 結合} = (A - B) / A \times 100$$

A : 熱変性 collagen 反応上清中 vWF : Ag

B : fibrillar collagen 反応上清中 vWF : Ag

8. マウスモノクローナル抗体: 当教室の嶋らの作製した von Willebrand 因子に対する 2 種のモノクローナル抗体<sup>20)</sup>を用いた. 個々のモノクローナル抗体の vWF subunit の認識部位は, NMC-vW/3 は vWF の SP-V8 による酵素分解にて得られた SPI (残基 911~1365) に, NMC-vW/4 は SP III の SP I 以外の部位 (残基 1~910) にある. NMC-vW/3 は純化 vWF の collagen 結合を抑制し, NMC-vW/4 は正常血小板多血漿の ristocetin 凝集を抑制する抗体である.

## 成 績

### 1. Collagen 結合測定法の検討

Collagen 結合測定の条件および反応の特異性について下記の項目を検討した.

a. Collagen 濃度: Fibrillar collagen あるいは熱変性 collagen をリン酸水素二ナトリウム溶液 (20 mmol/L, pH7.5) で希釈し, 正常人プール血漿 20  $\mu$ l と等量混合し各種濃度における collagen 結合を測定した. Fibrillar collagen 濃度が 15.6  $\mu$ g/dl より vWF と collagen との反応が明瞭になり, 終濃度 500  $\mu$ g/ml では collagen 結合は 90 % を示しそれ以上の濃度では 95 % 前後で濃度による変化が認められなくなった. 熱変性 collagen の collagen 結合は測定感度以下であり, vWF との反応は認められなかった. 以上より collagen 結合測定系における至適 collagen 濃度は 750  $\mu$ g/dl とした (Fig. 1-a).

b. 反応時間: 反応時間を 5 分, 10 分, 20 分, 30 分, 40 分, 50 分とし, 各反応時間における collagen 結合を測定した. Collagen 結合は 5 分で 95 % になり 20 分までは 95 % を示したが以後時間が経るにしたがい漸減傾向を示し 50 分後では 86 % であった. 従って collagen 結合測定系における至適反応時間は 15 分と判断した (Fig. 1-b).

c. vWF 部分純化物による collagen 結合: Collagen 結合測定系で正常人プール血漿の代わりに vWF 部分純化物 (終濃度 1.6  $\mu$ g/ml) 20  $\mu$ l を用い各種濃度の fibrillar collagen および熱変性 collagen (終濃度 75  $\mu$ g/ml より

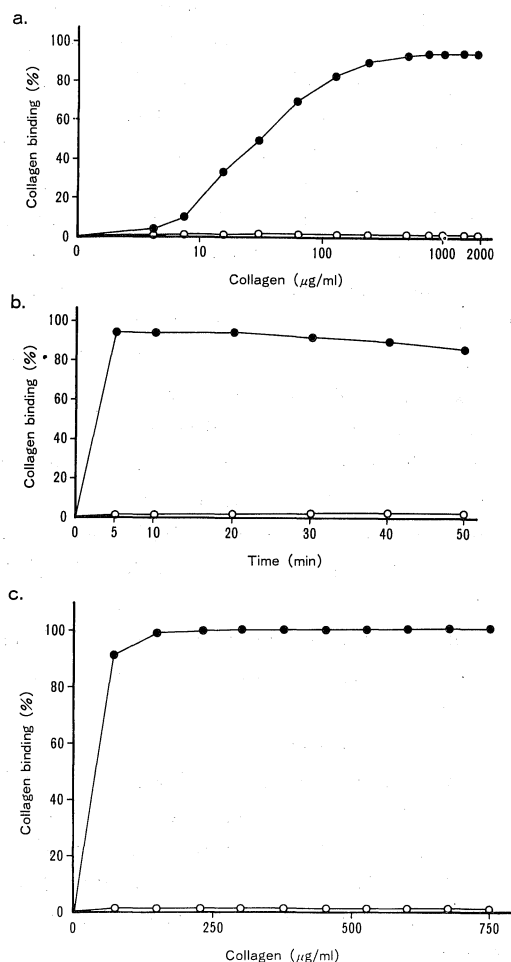


Fig. 1. Binding of vWF to human type III fibrillar collagen.

a: Twenty  $\mu$ l of several diluted fibrillar collagen or denatured collagen was incubated with twenty  $\mu$ l of normal plasma for 15 min at 37°C. After centrifugation, vWF : Ag of supernatant was measured by ELISA. Collagen binding was estimated as described under "Materials and Methods".

b: Twenty  $\mu$ l of several concentrations of fibrillar collagen or denatured collagen was incubated with purified vWF (1.6  $\mu$ g/ml) by the same methods described above and collagen binding was estimated.

c: Twenty  $\mu$ l of fibrillar collagen (750  $\mu$ g/ml) or denatured collagen (750  $\mu$ g/ml) was incubated with twenty  $\mu$ l of normal plasma for 5, 10, 20, 30, 40 and 50 min at 37°C. After centrifugation, collagen binding was estimated.

● — ● ; fibrillar collagen.

○ — ○ ; denatured collagen.

750 $\mu$ g/ml) 20 $\mu$ l と反応し collagen 結合を測定した。Collagen 結合は fibrillar collagen 濃度 75 $\mu$ g/ml で 90% を示しそれ以上の濃度では 95% 以上を呈し、熱変性 collagen では測定感度以下であった (Fig. 1-c)。

d. 抗凝固剤の影響: Collagen 結合測定系で正常人プール血漿 (クエン酸血漿) の代わりに、ヘパリン血漿, EDTA 血漿を用い collagen 結合を測定した (collagen 終濃度 750 $\mu$ g/ml)。クエン酸血漿, ヘパリン血漿, EDTA 血漿の collagen 結合はそれぞれ  $96 \pm 1.9\%$ ,  $97 \pm 1.3\%$ ,  $96 \pm 1.6\%$  (平均 $\pm$ SD) で有意差は無かった。更に各種濃度の EDTA, ヘパリンを用い同様に collagen 結合を検討したが、濃度差による変化は認めなかった。

e. NMC-vW/3 および NMC-vW/4 の collagen 結合に及ぼす影響: collagen 結合測定系で正常人プール血漿 50 $\mu$ l に NMC-vW/3 あるいは NMC-vW/4 をそれぞれ 25 $\mu$ l (終濃度 0.8 $\mu$ g/ml) と 50 $\mu$ l (終濃度 1.6 $\mu$ g/ml) 加え、これらにリン酸水素ナトリウム溶液を加え全体を 100 $\mu$ l にし 37 $^{\circ}$ C 2 時間インキュベートした。

NMC-vW/3 は終濃度 0.8 $\mu$ g/ml で vWF の collagen 結合を完全に抑制したが NMC-vW/4 は抑制しなかった (Fig. 2)。

## 2. 正常成人の collagen 結合

男 25 名 女 25 名の collagen 結合を前述の方法で測定した。同時にそれぞれの Rcof 活性と vWF: Ag も測定し collagen 結合と対比した。健康成人男の collagen 結合は 87.5% ~ 98.1% ( $93.5 \pm 2.6\%$ ), Rcof は 72% ~ 240% ( $128.6 \pm 40.3\%$ ), vWF: Ag は 76% ~ 220% ( $128.4 \pm 39.3\%$ ) であった。Collagen と結合した vWF: Ag 量を示す vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 は 69.9% ~ 210.8% ( $120.4 \pm 38.5\%$ ) で Rcof と vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 の相関係数は  $r=0.91$ , Rcof と vWF: Ag の相関係数は  $r=0.90$  であった。健康成人女の collagen 結合は 84.0% ~ 96.1% ( $93.3 \pm 2.7\%$ ), Rcof は 56% ~ 152% ( $113.0 \pm 19.4\%$ ), vWF: Ag は 49% ~ 178% ( $117.2 \pm 28.8\%$ ) で vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 は 44.7% ~ 168.4% ( $109.5 \pm 27.9\%$ ) で Rcof と vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 の相関係数は  $r=0.82$ , vWF: Ag と Rcof の相関係数は  $r=0.81$  であった。健康成人男女総合の collagen 結合は 84.0% ~ 98.1% ( $93.4 \pm 2.6\%$ ), Rcof は 56% ~ 240% ( $120 \pm 31.3\%$ ), vWF: Ag は 49% ~ 220% ( $122.2 \pm 34.0\%$ ) で vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 は 44.7% ~ 210.8% ( $114.4 \pm 33.2\%$ ) で Rcof と vWF: Ag  $\times$  collagen 結合/100 の相関係数は  $r=0.87$ , vWF: Ag と Rcof の相関係数は  $r=0.86$  であった (Fig. 3, Fig. 4.)。

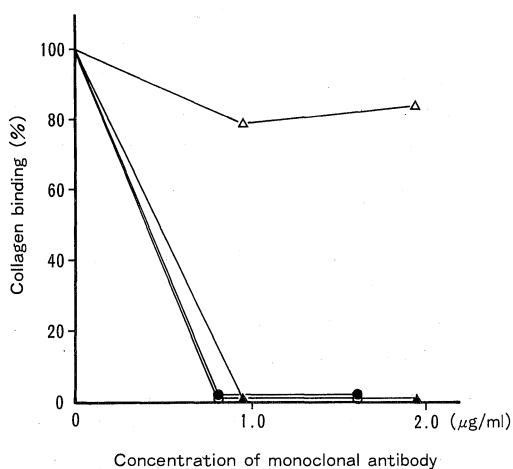


Fig. 2. Inhibitory effects of two monoclonal antibodies, NMC-vW/3 and NMC-vW/4, on the binding of vWF to human type III fibrillar collagen. The collagen binding was assayed essentially as described under "Materials and Methods".

○—○; NMC-vW/3 and fibrillar collagen  
●—●; NMC-vW/3 and denatured collagen  
△—△; NMC-vW/4 and fibrillar collagen  
▲—▲; NMC-vW/4 and denatured collagen

## 考 案

Collagen は生体タンパク質の中で最も多量を占め、血管、皮膚、骨などの結合組織成分の主たる構成要素で、現在遺伝的に異なる 12 の分子種 (collagen 型) が存在し、血管壁には I, III, IV, V, VI 型 collagen が存在している<sup>22)</sup>。I 型 collagen は血管壁の外膜、中膜の比較的大い線維性結合組織として存在し、III 型は I 型と共存するがより細い線維成分を有していることが知られている<sup>22)</sup>。

vWF は損傷血管内皮下組織の collagen 線維と結合することが知られるようになったが、各種 collagen の vWF 結合の検討では III 型 collagen が最もよく、線維成分が細く表面積が多いためとされており<sup>23)13)</sup>、またヒト以外の collagen の結合については Duggan et al.<sup>17)</sup> が bovine tendon collagen type I を用い報告している。

著者はヒト臍帯より抽出純化された III 型 collagen を用い血漿 vWF の collagen 結合を検討した。測定系における collagen の至適濃度は 500 $\mu$ g/ml 以上で collagen 結合が 90% 以上を示し、至適濃度は 750 $\mu$ g/ml であった。反応時間は 5 分の反応で 95% 以上の結合を示し 20 分まで変化を認めなかったため 15 分を至適反応時間とした。この反応系では反応時間が経るにしたがい col-

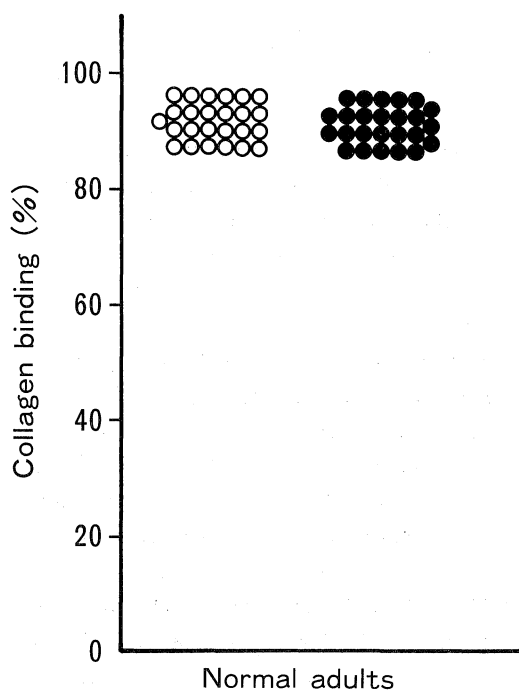


Fig. 3. Collagen bindings in healthy adults.  
Normal female is indicated as open circles (○) and normal male as closed circles (●).

lagen 結合の減少をみたが, Brown et al.<sup>24)</sup>は soluble bovine tendon type I collagen を用いた collagen 固相法による測定系で collagen 結合を測定したところ, 反応時間 2 時間を最大に結合は以後漸減したと報告しており, collagen と vWF の結合様式は不明であるが可逆的な反応かもしれない。

Cockburn et al.<sup>25)</sup>は, vWF は血管壁の subendothelium にある collagen と direct に結合するのではなく fibronectin が仲介すると報告している。そこで第 VIII 因子製剤より純化した vWF を用い本測定系の検討を行った。純化 vWF 1.6 $\mu$ g/dl に対して 75 $\mu$ g/ml の低濃度ではほぼ 90% 以上結合し本測定系が vWF と collagen の特異的な結合によるものであるといえた。

vWF にはいくつかの機能的ドメインがありヘパリン結合ドメインはその一つで vWF subunit の残基 449~728 にあると考えられており<sup>26)</sup>, またカルシウムイオンは各種凝固因子の活性化に必須の因子であるが vWF-collagen 結合に及ぼす影響については十分解明されていない。今回の結果はヘパリン, カルシウムとも vWF-collagen 結合には全く影響を及ぼさなかった。

当教室の嶋らの作製した vWF に対するモノクローナ

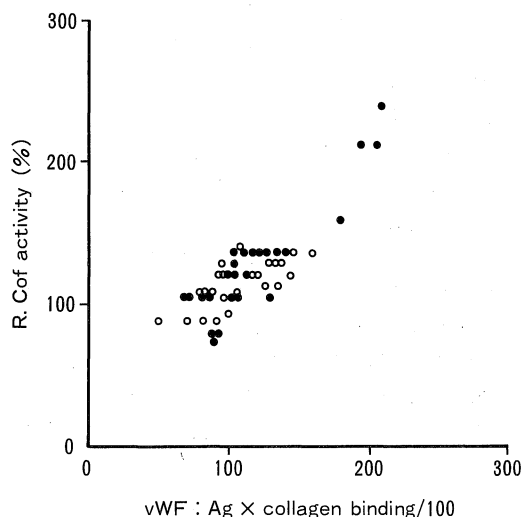


Fig. 4. Relationship between vWF: Ag $\times$ collagen binding/100 and Rcof in healthy adults.  
Normal female is indicated as open circles (○) and normal male as closed circles (●).

ル抗体のうち collagen 結合を特異的に抑制する NMC-vW/3 および ristocetin 凝集を抑制する抗 vWF モノクローナル抗体 NMC-vW/4 を用い本測定系の検討を行ったところ NMC-vW/3 は 0.8 $\mu$ g/dl で本測定系における vWF の collagen 結合を完全に抑制したのに対して NMC-vW/4 の影響は認められなかった。したがって著者の測定系における collagen 結合は ristocetin binding domain を有する vWF fragment (残基 1~910) は関与しないが, collagen binding domain を有する vWF fragment SPI (残基 911~1365) の関与する反応を観察している測定系であると考えられた。

本測定系を用い正常成人の collagen 結合を測定したところ男女差は無く, Rcof, vWF: Ag 値ともよく相関していた。

以上のごとく著者の collagen 結合の測定系は 20 $\mu$ l と少量の検体で測定可能な液相法の測定系であり, 簡便で固相法にみられるごとく長時間の反応を必要としない, またヒト胎盤由来の type III soluble collagen を用いることでヒトの in vivo に近い collagen と vWF の反応をみる測定系であると思われた。

## 結 語

ヒト胎盤由来の type III soluble collagen を用い正常ヒト血漿中の vWF の collagen 結合測定系を確立した。

1. 各種濃度の collagen と正常血漿および純化 vWF の

反応は, collagen 濃度の増加にともない collagen 結合が上昇した。Collagen の至適濃度は  $750\mu\text{g/ml}$  で, 至適反応時間は 15 分であった。抗凝固剤 (EDTA, ヘパリン) は collagen 結合の測定に影響を与えなかった。

2. 本測定系における collagen 結合は vWF fragment SP I (残基 911~1365) を認識する抗体 NMC-vW/3 により完全に抑制された。

3. 健康成人における collagen 結合は  $93.4 \pm 2.6\%$  で, collagen と結合した vWF:Ag 量を示す vWF:Ag  $\times$  collagen 結合/100 は Rcof とよく相関した。

本論文の要旨は, 第 30 回日本臨床血液学会総会において発表した。なお, 本研究は昭和 63 年度及び平成元年度文部省科研重点領域研究「血栓性素因の分子生物学的解析とその臨床応用」の助成を得た。

## 文 献

- 1) 清水信義: ヒト染色体の遺伝子マッピング. 日本臨床 47 増刊 DNA 診断: 20-58, 1989.
- 2) Ginsburg, D., Handin, R. I., Bonthron, D. T., Doonlon, T. A., Bruns, G. A. P., Latt, S. A. and Orkin, S. H.: Human von Willebrand factor (vWF): Isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal location. *Science* 228: 1401-1406, 1985.
- 3) Bockensted, T. P., Greenberg, J. M. and Handin, R. I.: Structural basis of von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib and collagen. Effect of disulfide reduction and limited proteolysis of polymeric von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 77: 743-749, 1986.
- 4) Ruggeri, Z. M., Bader, R. and De Marco, L.: Glanzman thrombasthenia: deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6038-6041, 1982.
- 5) Ruggeri, Z. W. and Zimmerman, T. S.: von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 70: 895-904, 1987.
- 6) Titani, K., Kumar, S., Takio, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Ashida, K., Walsh, K. A., Chopek, M. W., Sadler, J. E. and Fujikawa, K.: Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* 25: 3171-3184, 1986.
- 7) Foster, P. A., Fulcher, C. A., Marti, T., Titani, K. and Zimmerman, T. S.: A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 262: 8443-8446, 1987.
- 8) Takahashi, Y., Kalafatis, M., Girma, J. P., Sewerin, K., Anderson, L. O. and Meyer, D.: Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor. *Blood* 70: 1679-1682, 1987.
- 9) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Russell, S. C., Roberts, J. R., Elder, J. H., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: Von Willebrand factor; a reduced and alkylated 52/48kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 261: 381-385, 1986.
- 10) Plow, E. F., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. A. and Ginsberg, M. H.: The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 8057-8061, 1985.
- 11) Sixma, J. J., Sakariassen, K. S., Stel, H. V., Houdijk, W. P. M., Maur, D. W., Hamer, R. J., Groot, P. G. and Mourik, J. A.: Functional domains on von Willebrand factor recognition of discrete tryptic fragments by monoclonal antibodies that inhibit interaction of von Willebrand factor with platelets and with collagen. *J. Clin. Invest.* 74: 736-744, 1984.
- 12) Kalafatis, M., Takahashi, Y., Girma, J. P. and Meyer, D.: Localization of a collagen interactive domain of human von Willebrand factor between amino acid residues gly 911 and glu 1365. *Blood* 70: 1577-1583, 1987.
- 13) Roth, G. J., Titani, K., Hoyer, L. W. and Hickey, M. J.: Localization of binding sites within human von Willebrand factor for monomeric type III collagen. *Biochemistry* 25: 8357-8361, 1986.
- 14) Pareti, F. I., Niiya, K., McPherson, J. M. and Ruggeri, Z. M.: Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen type I and

- III. J. Biol. Chem. **262**: 13835-13841, 1987.
- 15) Perret, E. A., Furlan, M., Jeno, P. and Beck, E. A. : Von Willebrand factor-dependent agglutination of washed fixed human platelets by insoluble collagen isolated from bovine aorta. J. Lab. Med. **107**: 244-252, 1985.
- 16) Harrison, P., Wilbourn, B. R., Lawrie, A. S., Dalton, R. G., Armstrong, A. L. and Savidge, G. F. : A modified collagen binding assay for von Willebrand factor. Thromb. Haemostas. **62**: 222-228, 1989.
- 17) Duggan, M. J., Dimichele, D. M., Christian, M. J., Fink, L. M. and Hathaway, W. E. : Collagen-binding of von Willebrand's factor antigen in the classification of von Willebrand's disease. Am. J. Clin. Pathol. **88**: 97-102, 1987.
- 18) 高瀬俊夫 : フォン・ウィルブランド因子の測定法(2). 検査と技術 **15**: 1283-1287, 1987.
- 19) 高瀬俊夫, 吉川 昇, 植木一博, 岡本裕宏, 安居資司, 福井 弘 : RIPA-testkit を用いた von Willebrand 因子活性の測定. 診療と新薬 **19**: 157-161, 1982.
- 20) 嶋 緑倫, 森本純司, 今井俊介, 螺良義彦, 吉岡章, 福井 弘 : von Willebrand 因子 (vWF) に対するモノクローナル抗体の作製とその免疫学的特性. 奈医誌. **36**: 662-669, 1985.
- 21) 大島 章, 若崎久生, 唄 安夫, 村垣泰光 : 動脈硬化の血管構築成分—コラーゲン代謝異常を中心に. 実験医学 **6**: 1462-1467, 1988.
- 22) Fuller, G. C. and Mann, S. W. : Mechanisms of fibrosis. Rev. Biochem. Toxicol. **3**: 193, 1981.
- 23) Santoro, S. A. : Adsorption of von Willebrand factor/factor VIII by the genetically distinct interstitial collagens. Thromb. Res. **21**: 689-693, 1981.
- 24) Brown, J. E. and Bosak, J. O. : An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. Thromb. Res. **43**: 303-311, 1986.
- 25) Cockburn, C. G., Fitzsimmons, C. M. and Baranes, M. J. : The interaction of fibronectin (fn) with native, polymeric collagen (collagen fibers) : comparison with von Willebrand factor (vWF) -binding by collagen. Thromb. Haemostas. **61**: 378-385, 1989.
- 26) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Roberts, J. R., Kostel, P., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S. : A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728. J. Biol. Chem. **262**: 1734-1739, 1987.